

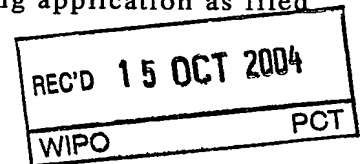
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23. 8. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年10月 8日



出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-349343  
[ST. 10/C]: [JP2003-349343]

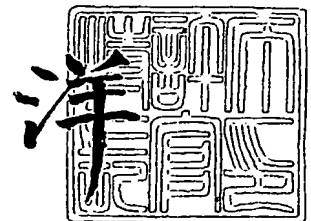
出 願 人  
Applicant(s): 国立大学法人京都大学

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 I10J1126  
【提出日】 平成15年10月 8日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61B 10/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若松台 1-5-8-203  
    【氏名】 岩田 博夫  
【発明者】  
    【住所又は居所】 滋賀県大津市茶戸町 17-3  
    【氏名】 加藤 功一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都市左京区丸太町通川端東入東丸太町 27番地  
    【氏名】 山内 文生  
【特許出願人】  
    【識別番号】 500160251  
    【氏名又は名称】 岩田 博夫  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503090522  
    【氏名又は名称】 加藤 功一  
【代理人】  
    【識別番号】 100077012  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岩谷 龍  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 066372  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0311584  
    【包括委任状番号】 0311585

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

エレクトロポレーション法により細胞に核酸を導入する方法であって、  
(A) 電極の表面に核酸を担持させる工程；  
(B) 得られた核酸担持電極の表面に細胞を接着させる工程；および  
(C) 接着した細胞に電気パルスを印加する工程；  
からなる方法。

## 【請求項 2】

エレクトロポレーション法により細胞に核酸を導入する方法であって、  
(a) カチオン性表面電極基板を提供する工程；  
(b) 該カチオン性表面電極基板の表面に核酸を吸着、担持させる工程；  
(c) 工程 (b) で得られた核酸担持電極基板の表面に細胞を接着させる工程；および  
(d) 該細胞に電気パルスを印加する工程；  
からなる方法。

## 【請求項 3】

カチオン性表面電極基板が、電極基板の表面に、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板である請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

カチオン性表面電極基板が、電極基板の表面に、末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にアニオン性高分子が吸着され、さらにその表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板である請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

工程 (b) を、カチオン性表面電極基板の表面に直接核酸を 1 回だけ吸着させるか、あるいは該表面に核酸およびカチオン性高分子を、核酸、カチオン性高分子、核酸の順序で交互吸着法により積層させることにより行う請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 6】

電極基板が、金、銀および白金から選ばれる貴金属の電極基板である請求項 3 または 4 記載の方法。

## 【請求項 7】

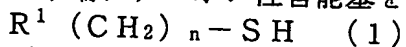
電極基板が、金電極基板である請求項 3 または 4 記載の方法。

## 【請求項 8】

金電極基板が、金蒸着したガラス基板である請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物が、式 (1) :



(式中、 $R^1$  はアニオン性官能基を表し、 $n$  は 1 ~ 40 の整数を表す。)  
で示されるチオール化合物である請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 10】

$R^1$  がカルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基およびホスホン酸基から選ばれる基である請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

式 (1) で示されるチオール化合物が、11-メルカプトウンデカン酸、8-メルカプトオクタン酸、15-メルカプトトヘキサデカン酸から選ばれるメルカプトアルカン酸である請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 12】

カチオン性高分子が、ポリエチレンジイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリビニルピリジン、アミノアセタール化ポリビニルアルコール、1~4級アミンを側鎖末

端に持つアクリル系またはメタクリル系ポリマー、酸処理ゼラチン、プロタミン、ポリリジン、ポリオルニチン、ポリアルギニン、キトサン、DEAE-セルロース、DEAE-デキストランおよびポリアミドアミンデンドリマーから選ばれる高分子である請求項3または4記載の方法。

【請求項13】

末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物が、式(2)：

$$R^2 (CH_2)_n - SH \quad (2)$$

(式中、 $R^2$ はカチオン性官能基を表し、 $n$ は1～40の整数を表す。)で示されるチオール化合物である請求項4記載の方法。

【請求項14】

$R^2$ がアミノ基である請求項13記載の方法。

【請求項15】

核酸がDNA、RNA、アンチセンス核酸、siRNAまたはそれらの発現ベクターである請求項1または2記載の方法。

【請求項16】

核酸がタンパク質をコードするDNAまたはその一部である請求項1または2記載の方法。

【請求項17】

工程(B)を、核酸担持電極の表面で細胞を培養することにより行う請求項1記載の方法。

【請求項18】

工程(c)を、核酸担持電極基板の表面で細胞を培養することにより行う請求項2記載の方法。

【請求項19】

工程(C)を、細胞を介して電極基板に対峙して反対電極を設け、両電極間に電気パルスが発生させることにより行う請求項1記載の方法。

【請求項20】

工程(d)を、細胞を介して電極基板に対峙して反対電極を設け、両電極間に電気パルスが発生させることにより行う請求項2記載の方法。

【請求項21】

カチオン性表面電極基板が、マイクロパターン化表面をもつ基板である請求項2記載の方法。

【請求項22】

電極基板の表面に、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板。

【請求項23】

ガラス基板上に金蒸着した金電極基板の表面に、式(1)：

$$R^1 (CH_2)_n - SH \quad (1)$$

(式中、 $R^1$ はアニオン性官能基を表し、 $n$ は1～40の整数を表す。)で示されるチオール化合物の単分子膜が形成されており、該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸導入方法

【技術分野】

【0001】

本発明は核酸導入方法に関し、さらに詳しくは、エレクトロポレーション法により核酸を細胞に導入する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞への遺伝子導入方法は、遺伝子の機能や遺伝子にコードされているタンパク質の性質を解明したり、組み換えタンパク質を多量に生産する場合に利用されている。また、細胞への遺伝子導入法は、目的の酵素やサイトカインの遺伝子を患者の細胞内に導入し、その遺伝子により体内に目的とする物質を生産させて疾患の治療を行う場合にも利用されている。

【0003】

ヒトゲノムのDNA塩基配列の解読がほぼ終了し多くの機能未知の遺伝子の存在が予測され、今後、これらの新規ヒト遺伝子の機能解析が研究の大きなターゲットとなるが、数万種類に及ぶ遺伝子の機能解析を行うには、網羅的かつ高速に遺伝子の過剰発現やノックアウトできる手法が必要である。

【0004】

細胞内に遺伝子を導入する技術としては、生物学的手段、すなわちアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス由来のウイルスベクターを利用する導入方法と、リポフェクション法（リポソーム法）、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などの物理的手段を用いる導入方法とに大別される。

【0005】

これらのうち、ウイルスベクターを利用する方法は、遺伝子導入効率は高いが、ウイルスベクターの作製が煩雑である、安全性に問題があるなどの難点がある。リポフェクション法は、安全性は高いが、ウイルスを利用する方法に較べて、遺伝子導入効率が低い、細胞毒性が強いなどの難点がある。

【0006】

マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などの直接導入法は、DNAもしくは細胞の障害が大きく、効率よく遺伝子を導入するための最適化条件の検討が煩雑であり、また技術的操作に関しても特殊な技能や装置が必要であるなどの難点がある。

【0007】

また、従来のエレクトロポレーション法は、遺伝子と細胞とを懸濁させた媒体を平行板などの電極間に配置し、両電極間に電気パルス印加して細胞の細胞膜に小孔を生じさせ、それが修復される前に細胞外の遺伝子を細胞内に取り込ませる方法がとられていた（非特許文献1、2）。この方法は、遺伝子導入効率は高いものの、細胞の障害が大きい、電気パルス印加して遺伝子導入する時期や場所を自由に選択し難いなどの難点がある。

【0008】

さらに、近年、遺伝子の機能を高速に解析するため、発現プラスミドを組み込んだcDNAをプリントしたガラス基板上で細胞を培養し、細胞に遺伝子をリポフェクション法により導入するトランスフェクショナルアレイが開発された（非特許文献3）。この方法は、トランスフェクションにリポフェクション法を用いるものであるため、リポフェクション法に起因する前記した難点が依然として存在している。

【非特許文献1】EMBOジャーナル、1982年、第1巻、841～845頁

【非特許文献2】バイオエレクトロケミストリー アンド バイオエネルギーティクス (Bioelectrochem. Bioenerg.) 1999年、第48巻、3～16頁

【非特許文献3】ネイチャー、2001年、第411巻、107～110頁

【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、従来のエレクトロポレーション法の問題を解決した遺伝子導入方法を提供するものであり、より具体的には、細胞に障害を与えることなく、遺伝子を効率よく細胞に導入するとともに、望ましい時間に細胞集団内の望ましい位置で遺伝子導入を実施し得る方法を提供するものである。

## 【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、従来のエレクトロポレーション法による遺伝子導入方法を改良すべく種々研究を重ねた結果、電極の表面に核酸を担持させ、得られた核酸担持電極の表面に細胞を接着させ、ついで接着した細胞に電気パルスを印加すれば、細胞にさほど障害を与えることなく、効率よく遺伝子を細胞に導入し得るとともに、所望の時期にかつ所望の位置でエレクトロポレーションを実施し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、

(1) エレクトロポレーション法により細胞に核酸を導入する方法であって、

(A) 電極の表面に核酸を担持させる工程；

(B) 得られた核酸担持電極の表面に細胞を接着させる工程；および

(C) 接着した細胞に電気パルスを印加する工程；

からなる方法、

(2) エレクトロポレーション法により細胞に核酸を導入する方法であって、

(a) カチオン性表面電極基板を提供する工程；

(b) 該カチオン性表面電極基板の表面に核酸を吸着、担持させる工程；

(c) 工程 (b) で得られた核酸担持電極基板の表面に細胞を接着させる工程；および

(d) 該細胞に電気パルスを印加する工程；

からなる方法、

(3) カチオン性表面電極基板が、電極基板の表面に、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板である前記 (2) 記載の方法、

(4) カチオン性表面電極基板が、電極基板の表面に、末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にアニオン性高分子が吸着され、さらにその表面にカチオン性高分子が吸着させてなるカチオン性表面電極基板である前記 (2) 記載の方法、

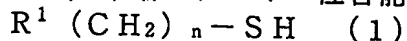
(5) 工程 (b) を、カチオン性表面電極基板の表面に直接核酸を 1 回だけ吸着させるか、あるいは該表面に核酸およびカチオン性高分子を、核酸、カチオン性高分子、核酸の順序で交互吸着法により積層させることにより行う前記 (2) 記載の方法、

(6) 電極基板が、金、銀および白金から選ばれる貴金属の電極基板である前記 (3) または (4) 記載の方法、

(7) 電極基板が、金電極基板である前記 (3) または (4) 記載の方法、

(8) 金電極基板が、金蒸着したガラス基板である前記 (7) 記載の方法、

(9) 末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物が、式 (1)：



(式中、 $R^1$  はアニオン性官能基を表し、 $n$  は 1 ~ 40 の整数を表す。)

で示されるチオール化合物である前記 (3) 記載の方法、

(10)  $R^1$  がカルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基およびホスホン酸基から選ばれる基である前記 (9) 記載の方法、

(11) 式 (1) で示されるチオール化合物が、11-メルカプトウンデカン酸、8-メルカプトオクタン酸、15-メルカプトヘキサデカン酸から選ばれるメルカプトアルカン酸である前記 (9) 記載の方法、

(12) カチオン性高分子が、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリビニルピリジン、アミノアセタール化ポリビニルアルコール、1～4級アミンを側鎖末端に持つアクリル系またはメタクリル系ポリマー、酸処理ゼラチン、プロタミン、ポリリジン、ポリオルニチン、ポリアルギニン、キトサン、DEAE-セルロース、DEAE-デキストランおよびポリアミドアミン dendrimer から選ばれる高分子である前記(3)または(4)記載の方法、

(13) 末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物が、式(2)：  

$$R^2 (CH_2)_n - SH \quad (2)$$

(式中、 $R^2$ はカチオン性官能基を表し、 $n$ は1～40の整数を表す。)

で示されるチオール化合物である前記(4)記載の方法、

(14)  $R^2$ がアミノ基である前記(13)記載の方法、

(15) 核酸がDNA、RNA、アンチセンス核酸、siRNAまたはそれらの発現ベクターである前記(1)または(2)記載の方法、

(16) 核酸がタンパク質をコードするDNAまたはその一部である前記(1)または(2)記載の方法、

(17) 工程(B)を、核酸担持電極の表面で細胞を培養することにより行う前記(1)記載の方法、

(18) 工程(c)を、核酸担持電極基板の表面で細胞を培養することにより行う前記(2)記載の方法、

(19) 工程(C)を、細胞を介して電極基板に対峙して反対電極を設け、両電極間に電気パルスが発生させることにより行う前記(1)記載の方法、

(20) 工程(d)を、細胞を介して電極基板に対峙して反対電極を設け、両電極間に電気パルスが発生させることにより行う前記(2)記載の方法、および

(21) カチオン性表面電極基板が、マイクロパターン化表面をもつ基板である前記(2)記載の方法、  
 である。

#### 【0012】

また、本発明は、

(22) 電極基板の表面に、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板、および

(23) ガラス基板上に金蒸着した金電極基板の表面に、式(1)：  

$$R^1 (CH_2)_n - SH \quad (1)$$

(式中、 $R^1$ はアニオン性官能基を表し、 $n$ は1～40の整数を表す。)  
 で示されるチオール化合物の単分子膜が形成されており、該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板、  
 である。

#### 【発明の効果】

##### 【0013】

本発明によれば、細胞に障害を与えることなく、核酸を効率よく細胞に導入することができるとともに、望ましい時期に電極上の望ましい位置で細胞に導入することができる、エレクトロポレーション法による核酸導入方法が提供される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0014】

本発明の一側面は、エレクトロポレーション法により細胞に核酸を導入する方法であって、

- (A) 電極の表面に核酸を担持させる工程；
  - (B) 得られた核酸担持電極の表面に細胞を接着させる工程；および
  - (C) 接着した細胞に電気パルスを印加する工程
- からなる方法である。

## 【0015】

以下、前記各工程について順次説明する。

工程 (A) :

電極に核酸を担持させるには、たとえば、

(A1) カチオン性表面電極基板を提供し、ついで該カチオン性表面電極基板の表面に核酸を吸着させる方法、

(A2) カチオン性表面電極基板を提供し、ついで該カチオン性表面電極基板の表面に核酸とカチオン性高分子とを交互に吸着させて、カチオン性高分子-核酸-カチオン性高分子のように多層を形成させる方法、  
などを採用することができる。

## 【0016】

(カチオン性表面電極基板の提供)

前記カチオン性表面電極基板は、電極基板の表面がプラスに荷電したものであればよく、その様なものとしては、たとえば

(a1) 電極基板の表面に、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ、該単分子膜の表面にカチオン性高分子が吸着されてなるカチオン性表面電極基板、

(a2) 電極基板の表面に、末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜が形成されており、かつ該単分子膜の表面にアニオン性高分子が吸着され、さらにその表面にカチオン性高分子が吸着させてなるカチオン性表面金属基板、  
などがあげられる。

## 【0017】

前記 (a1) のカチオン性表面電極基板は、たとえば、1) 電極基板の表面に、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜を形成させ、ついで2) 該単分子膜の表面にカチオン性高分子を吸着させることにより製造できる。

## 【0018】

また、前記 (a2) のカチオン性表面電極基板は、たとえば、1) 電極基板の表面に、末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物、ジスルフィド化合物もしくはスルフィド化合物の単分子膜を形成させ、2) 該単分子膜の表面にアニオン性高分子を吸着させ、ついで3) 該アニオン性高分子の表面にカチオン性高分子を吸着させることにより製造できる。

## 【0019】

電極基板における「基板」は、電極を支持するプレート、チップ(マイクロチップを含む)、アレイなどであり、それらを構成する基材は、電極を支持し得る絶縁性のものであればとくに制限がなく、たとえば、ガラス、マイカ、石英、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などの無機絶縁材料、あるいはポリエチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホンなどの有機絶縁材料を用いることができる。これらのうち、とくにガラス、マイカ、石英、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などの無機絶縁材料が好ましい。

## 【0020】

一方、電極基板における「電極」は、エレクトロポレーション法における電極になりうるものであればとくに制限がなく、金、銀、白金、銅などの金属からなる電極が好適にあ

げられる。

#### 【0021】

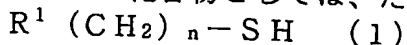
上記「基板」と「電極」とからなる電極基板の好ましい例は、ガラス基板、プラスチック基板もしくはマイカ基板の片面に、金、銀、白金などの貴金属の電極を設けたものがあげられ、より好ましい例は、ガラス基板もしくはマイカ基板の片面に金の電極を設けたものが好ましい。

#### 【0022】

基板の片面に電極を設けるには、公知の方法に従って行えばよく、たとえば上記金属を無機絶縁基板上に加熱または／および加圧などして合体させるなどの公知の手段を用いる方法があげられる。また、前記方法以外に、真空蒸着法、スパッタリング法、イオン注入法、メッキ法などもあげられる。

#### 【0023】

電極基板の表面に単分子膜を形成させるのに用いる、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物としては、たとえば、下記一般式(1)：

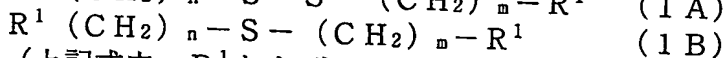
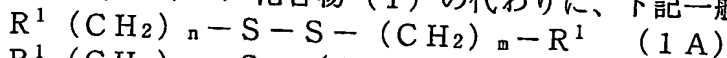


(式中、記号は前記と同一意味を有する)

で示されるチオール化合物があげられる。化合物(1)の好ましい例としては、アニオン性官能基である $R^1$ がカルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基、ホスホン酸基であり、 $n$ が1~40、好ましくは7~18のものがあげられる。

#### 【0024】

また、チオール化合物(1)の代わりに、下記一般式(1A)または(1B)：



(上記式中、 $R^1$ および $n$ は前記と同一意味を有し、 $m$ は1~40の整数を表す)

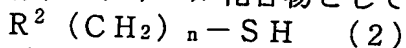
で示されるジスルフィド化合物またはスルフィド化合物を用いることもできる。該ジスルフィド化合物またはスルフィド化合物は対称型であっても、非対称型であってもよいが、対称型のもののほうが、均一な単分子膜が形成される意味で好ましい。

#### 【0025】

好ましい化合物(1)またはそのジスルフィドもしくはスルフィド化合物の具体例としては、たとえば、11-メルカプトウンデカン酸、8-メルカプトオクタン酸、15-メルカプトヘキサデカン酸、10-カルボキシデシルジスルフィドなどがあげられる。

#### 【0026】

また、電極基板の表面に単分子膜を形成させるのに用いる、末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物としては、たとえば、下記一般式(2)：

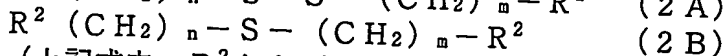
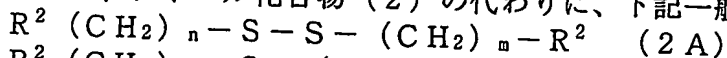


(式中、 $R^2$ はカチオン性官能基を表し、 $n$ は前記と同一意味を有する)

で示されるチオール化合物があげられる。 $R^2$ で示されるカチオン性官能基としては、たとえばアミノ基があげられ、 $n$ としては、1~40、好ましくは7~18の整数があげられる。

#### 【0027】

また、チオール化合物(2)の代わりに、下記一般式(2A)または(2B)：



(上記式中、 $R^2$ および $n$ は前記と同一意味を有し、 $m$ は1~40の整数を表す)

で示されるジスルフィド化合物またはスルフィド化合物を用いることもできる。該ジスルフィド化合物またはスルフィド化合物は対称型であっても、非対称型であってもよいが、対称型のもののほうが、均一な単分子膜が形成される意味で好ましい。

#### 【0028】

好ましい化合物(2)またはそのジスルフィドもしくはスルフィド化合物の具体例としては、たとえば、11-アミノ-1-ウンデカンチオールなどが好適にあげられる。

## 【0029】

電極基板の表面に単分子膜を形成させるには、常法にしたがって行えばよく、たとえば、電極基板をチオール化合物（式1または2）またはそのジスルフィド化合物（式1Aまたは2A）もしくはスルフィド化合物（式1Bまたは2B）の溶液に浸漬することにより実施することができる。これにより、電極基板上に高密度、高配向性な単分子膜が形成される。

## 【0030】

チオール化合物として、末端にアニオン性官能基を有するチオール化合物（1）またはそのジスルフィドもしくはスルフィド化合物（1Aもしくは1B）を用いた場合には、これら化合物の単分子膜の表面に、カチオン性高分子を吸着させることにより、前記（a1）のカチオン性表面電極基板が得られる。

## 【0031】

ここで使用される「カチオン性高分子」は、電極基板の表面に形成された単分子膜と電氣的結合（たとえばイオン結合）によって該単分子膜の表面に結合するカチオン性の高分子であればよく、たとえば、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリビニルピリジン、アミノアセタール化ポリビニルアルコール、1～4級アミンを側鎖末端にもつアクリル系あるいはメタクリル系ポリマー（たとえば、ポリ（N，N-ジメチルアミノエチルメタクリレートなど）、酸処理ゼラチン、ポリリジン、ポリオルニチン、ポリアルギニン、プロタミン、キトサン、DEAE-セルロース、DEAE-デキストラン、ポリアミドアミンデンドリマー（カチオニックデンドリマー）などがあげられる。これらのうち、とりわけポリエチレンイミンおよびポリアリルアミンが好ましい。

## 【0032】

前記カチオン性高分子の平均分子量は、500～5,000、好ましくは600～100,000である。たとえば、ポリエチレンイミンの場合は、その平均分子量は200～25,000が好ましく、とりわけ500～10,000が好ましい。またポリアリルアミンの場合は、その平均分子量は500～150,000、とりわけ1,000～70,000が好ましい。

## 【0033】

単分子膜の表面にカチオン性高分子を吸着させるには、該単分子膜の表面にカチオン性高分子の溶液を接触させることにより実施でき、たとえば、該単分子膜の表面に、カチオン性高分子を適当な緩衝液（たとえば、リン酸緩衝生理食塩水）に溶解した溶液を添加し、室温で静置することにより好適に実施できる。カチオン性高分子溶液の濃度は、特に限定されないが、0.1%～10%であるのが好ましい。かくして、単分子膜とカチオン性高分子とがイオン結合により吸着されて、前記（a1）のカチオン性表面電極基板が提供される。

## 【0034】

一方、チオール化合物として、末端にカチオン性官能基を有するチオール化合物（2）またはそのジスルフィドもしくはスルフィド化合物（2Aもしくは2B）を用いた場合には、これら化合物の単分子膜の表面に、まずアニオン性高分子を吸着させる。

## 【0035】

ここで使用される「アニオン性高分子」は、電極基板の表面に形成された単分子膜と電氣的結合（たとえばイオン結合）によって該単分子膜の表面に結合するアニオン性の高分子であればよく、たとえば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリ（2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸）のような合成高分子、アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、アルカリ処理ゼラチンのような天然高分子があげられる。

## 【0036】

単分子膜の表面にアニオン性高分子を吸着させるには、該単分子膜の表面にアニオン性高分子の溶液を接触させることにより実施でき、たとえば、該単分子膜の表面に、アニオン性高分子を適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）に溶解した溶液を添加し、

室温で静置することにより好適に実施できる。

【0037】

ついで、吸着したアニオン性高分子の表面に、カチオン性高分子を吸着させることにより、前記(a2)のカチオン性表面電極基板が得られる。ここで用いるカチオン性高分子は前記と同一のものを使用でき、吸着処理も前記と同様に実施できる。

【0038】

(カチオン性表面電極基板への核酸の担持)

前記で提供されたカチオン性表面電極基板の表面に核酸を担持させることにより、核酸担持電極基板が得られる。

本発明で使用される「核酸」は、ポリヌクレオチドであっても、オリゴヌクレオチドであってもよく、またDNAでもRNAでもよい。DNAの場合、プラスミドDNA、cDNA、ゲノミックDNAあるいは合成DNAであってもよい。「核酸」には、DNA誘導体またはRNA誘導体が含まれ、該誘導体とはホスホロチオエート結合を有する核酸、または酵素による分解を避けるためにインターヌクレオチドのリン酸部分、糖部分、塩基部分に化学修飾を施した核酸を意味する。

【0039】

「核酸」には、疾患症状の治療あるいは改善効果のある生理活性を有するタンパク質をコードしているプラスミドDNA、または疾患症状の予防、治療あるいは改善効果のある免疫反応を誘導するタンパク質をコードしているプラスミドDNA、あるいはこれらDNAの一部を含む。

「核酸」にはまた、アンチセンス核酸も包含する。「アンチセンス核酸」は特定のmRNA分子の少なくとも一部に相補的なDNA分子またはRNA分子であり、細胞内に導入されることにより、対応するmRNAとハイブリダイズして二本鎖の分子を形成する。細胞は二本鎖のmRNAを翻訳しないので、アンチセンス核酸は該mRNAの翻訳を干渉する。「核酸」には、さらにsiRNA(RNA干渉を起こす短い二本鎖RNA)を包含する。さらに、「核酸」には、アンチセンス核酸やsiRNAなどの発現ベクターを包含する。

【0040】

核酸がタンパク質をコードしているプラスミドDNAである場合、細胞内に導入されたとき、コードする遺伝情報を細胞内で発現するように構成された形態が好ましく、プロモータ等、目的遺伝子の発現に必要な要素を含有する。また、目的遺伝子が細胞内に導入されたかどうかを確認する必要がある場合、目的遺伝子のほかにさらにレポーター遺伝子を含んだDNAでもよい。

【0041】

「核酸」のサイズは特に制限されないが、一般に、10bp~200kbp、好ましくは、15bp~100kbpである。

【0042】

カチオン性表面電極基板の表面に核酸を吸着、担持させるには、カチオン性表面電極基板の表面に、核酸の溶液を接触させることにより実施でき、たとえば該カチオン性表面電極基板の表面に、核酸を適当な緩衝液(たとえば、リン酸緩衝生理食塩水)に溶解した溶液を添加し、室温に放置することにより好適に実施できる。吸着しない核酸は、カチオン性表面電極基板の表面を適当な緩衝液(たとえば、リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄することにより除去できる。かくして、核酸担持電極基板が得られる。

【0043】

なお、カチオン性表面電極基板の表面に、核酸およびカチオン性高分子を、核酸、カチオン性高分子、核酸の順序で交互吸着法により積層することによっても核酸担持電極基板が得られる。ここで交互に実施される核酸の吸着およびカチオン性高分子の吸着は、前記と同様にして実施することができる。

【0044】

工程(B):

本工程は、上記で得られた核酸担持電極基板の表面に、細胞を接着させる工程である。本発明で使用する「細胞」は、接着性のものであれば、どの生物由来の細胞（たとえば、任意の種類の（たとえば、細菌、酵母）または多細胞生物（たとえば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物）、植物（たとえば、単子葉植物、双子葉植物など）など）でもよい。たとえば、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両性類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）由来の細胞でも用いられ、より詳細には、哺乳動物（たとえば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、肉食類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類など）由来の細胞が用いられる。1つの実施形態では、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞、とくにヒト由来の細胞が用いられる。ヒト由来細胞の具体例としては、たとえば、ヒト子宮頸部癌細胞（H e L a）などのヒト由来株化細胞；ヒト胎児腎臓由来細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト大動脈平滑筋細胞、ヒト肝細胞、ヒト繊維芽細胞、ヒト角膜上皮細胞、ヒト角膜内皮細胞などのヒト由来初代培養細胞；間葉系幹細胞、胚性幹細胞、神経幹細胞などのヒト由来幹細胞などがあげられる。

#### 【0045】

核酸担持電極基板の表面に細胞を接着させる方法は、特に制限されず、たとえば、細胞の懸濁液を前記基板の上に添加するか、あるいは細胞を適当な培地に懸濁させ、得られた細胞懸濁液を基板上に滴下し、該細胞に適した条件下で培養することにより行うことができる。しかし、核酸を導入する細胞集団内の場所の限定および導入の効率の観点からは、核酸担持電極基板上で細胞を培養して行うのが好ましく、培養することにより細胞は増殖し、該基板の表面に接着する。接着しない細胞は、電気パルスを印加する前に除いておくのが望ましい。非接着細胞の除去は、たとえば、培地を適当な緩衝液と交換することにより行うことができる。

#### 【0046】

#### 工程 (C) :

細胞への電気パルスの印加は、表面に細胞が接着した核酸担持電極基板の電極を一方の電極（第1電極という）とし、細胞を介して第1電極と対峙して反対電極（第2電極という）を設け、第1電極と第2電極の間で、適当なエレクトロポレーターを用いて電気パルスを発生させることにより行うことができる。この際、電気パルスは交流または直流のいずれで発生させてもよいが、一般に直流で発生させるのが好ましい。

#### 【0047】

電気パルスを直流で発生させる場合には、核酸を担持した第1電極を陰極（-）としたときには、第2電極は陽極（+）とする。あるいはその逆も可能である。好ましくは、第1電極を陰極（-）とし、第2電極を陽極（+）とする。第2電極の材質は、電導性のものであればとくに限定されないが、たとえば金、白金、銀、銅、アルミニウム、ステンレス、タングステン、チタン、コバルトクロム合金、コバルトクロム-モリブデン合金（バイタリウム）などの金属、あるいはカーボン、透明電極材料であるITO（インジウムスズ酸化物）があげられる。

#### 【0048】

電気パルスの条件は、細胞の種類、導入される核酸の種類、基板上のカチオン性高分子の種類などにより、電場強度、電気パルスの長さ、パルス印加の回数などを適宜選択すればよい。通常、電場強度は10~500V/cm、好ましくは25~150V/cmであり、電気パルスの長さは1~99msec、好ましくは1~50msecであり、パルス印加の回数は1~99回、好ましくは1~5回であるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0049】

電気パルスを印加する時期は、特に限定されず、適宜選択できる。すなわち、細胞を核酸担持電極基板の上に播種後、培養し、該基板上に細胞を接着させてから、必ずしもすぐに電気パルスを印加する必要はなく、接着後望ましい時期、たとえば、細胞の播種から約4~5日以内であれば、自由に選択して電気パルスを印加することができる。この電気パ

ルスの印加により、細胞中に核酸が効率よく導入される。

#### 【0050】

上記本発明方法を実施するに当たって使用される核酸担持電極基板および電気パルス負荷システムの配置図の一例を示せば、図1の通りである。この図を用いて本発明方法を説明すると、たとえばガラス基板の表面に金薄膜電極(E)が設けられており、その上に核酸が担持された核酸-カチオン性高分子複合層(D)が設けられており、さらにその表面に細胞(C)が接着している。そして、この細胞はたとえばシリコンスペーサ(G)で区画化されており、ウェル中にはエレクトロポレーションバッファ(B)が充填されている。シリコンスペーサ(G)の上には金薄膜電極(E)と平行に反対電極となる金電極(F)が設けられている。金薄膜電極(E)と金電極(F)は電気パルス発信装置であるエレクトロポレーター(A)に接続されている。本例では、金薄膜電極(E)と金電極(F)との間隔は2mmに設定されており、ウェル面積は $13 \times 13 \text{ mm}^2$ に設定されている。電気パルスの負荷は、金薄膜電極(E)を陰極(-)とし、金電極(F)を陽極(+)とし、エレクトロポレーター(A)により電気パルスを発生させることにより、細胞(C)中に核酸(DNA)が導入される。

#### 【0051】

本発明の別の側面として、上記核酸導入法を、マイクロパターン化した表面を有する基板を用いて実施することができる。たとえば、核酸を担持させる前のカチオン性表面電極基板の表面を、適当な手段で区画化しておき、複数の異なった核酸をそれぞれ別個の区画に担持させることによりマイクロパターン化された核酸担持電極基板とすることができる。かかるマイクロパターン化された核酸担持金属基板を用いて本発明を実施すれば、核酸を導入する場所を限定することが可能である。

#### 【0052】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0053】

DNAを静電的に担持するためのカチオン性表面電極基板を作製した。まず、片面に金薄膜を蒸着したガラス基板に、末端にカルボキシル基をもつチオール化合物(11-メルカプトウンデカン酸、シグマ社製)の単分子膜を形成させた。この単分子膜上に、平均分子量800のポリエチレンジイミン(以下、PEI800と表示、アルドリッチ社製)を1%濃度で含むリン酸緩衝溶液(pH7.4)を添加し、30分間、室温で静置した。得られた基板の表面を十分に水洗し、窒素ガスで乾燥させ、カチオン性表面金電極基板を得た。

#### 【0054】

次に、上記で得られたカチオン性表面金電極基板の表面に、エタノールで殺菌したシリコンスペーサ(内面積:  $1.3 \times 1.3 \text{ cm}^2$ 、高さ: 2mm)を圧着し、固定した。次に、緑色蛍光タンパク質をコードするプラスミドDNA(pEGFP-C1、クロンテック社製)の0.05mg/mLリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を、シリコンスペーサ内のカチオン性表面金電極基板の表面上に添加し、室温、2時間放置して、表面にDNAを静電的に吸着、担持させた。吸着しなかったDNAを除去するため、リン酸緩衝生理食塩水で表面を十分に洗浄し、DNA担持金電極基板を得た。

#### 【0055】

ヒト胎児腎臓由来細胞(HEK293: (財)ヒューマンサイエンス財団より分譲)を血清含有培地(培地組成: 最小必須培地(MEM) (Gibco Life Technology)、10% ウシ胎児血清、100unit/mLペニシリン、0.1mg/mLストレプトマイシン)に懸濁させ、その懸濁液をDNA担持金電極基板の表面上に滴下した。これを37℃および5%CO<sub>2</sub>の雰囲気下で培養することで、細胞を表面に接着、成長させた。24時間後、培地を4℃のリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)と交換して非接着細胞を除去し、リン酸緩衝生理食塩水を満たした後、片面に金薄膜を蒸着したガラス基板を第2電極とし

てシリコンスぺーサに固定した。それらの配置を図1に示す。

#### 【0056】

次に、DNA担持金電極基板を陰極（－）、他方を陽極（＋）として高電圧パルス発生装置（Electrosquareporator T820、BTX社製）に接続し、電場強度75V/cm、パルス幅10msec、印加回数1回の条件で電気パルスを印加し、エレクトロポレーションを行った。パルス印加後、室温で5分間インキュベーションした後、ウェル内のリン酸緩衝生理食塩水をあらかじめ37℃に保温してあった血清含有培地で交換し、37℃および5%CO<sub>2</sub>の雰囲気下で細胞培養を行った。

#### 【0057】

エレクトロポレーションから48時間後に導入遺伝子の一過的発現の解析を行った。方法は、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光タンパク質（EGFP）に起因する緑色蛍光を発する細胞をカウントし、遺伝子導入効率を全細胞数当たりのEGFP陽性細胞数として算出した。

#### 【0058】

図2にエレクトロポレーションから48時間後のHEK293細胞の明視野位相差顕微鏡像（A）と蛍光顕微鏡像（B）を示す。この図からわかるように、基板表面上の細胞は障害を受けることなくEGFPを発現しており、そのEGFP陽性細胞率、すなわち遺伝子導入効率は80%であった。このことは、本発明の手法が効率的に遺伝子導入できる方法であることを明確に示す。

#### 【実施例2】

#### 【0059】

実施例1と同様に、DNA担持金電極基板上にHEK293細胞を播種し、接着させた後、電気パルスを印加してエレクトロポレーションを行った。その際、電気パルスの電圧を変化させ、遺伝子導入効率に対する電場強度の効果について検討した。なお、印加電圧以外のパルス印加条件は、実施例1と同じ（パルス幅10msec、パルス回数1回）とし、遺伝子導入効率は、電気パルス印加から48時間後のEGFP陽性細胞率として評価した。結果は図3の通りである。また同時に、細胞生存率に対する電場強度の効果を検討した。細胞生存率は、電気パルス印加から3時間後、細胞をトリプシン処理で回収し、トリパンブルー色素排除法により評価した。すなわち、トリパンブルーによって染色されなかった細胞の数（生細胞数）を求め、次式に従って生存率を算出した。

#### 【数1】

$$\text{生存率(\%)} = \frac{\text{[電気パルスを与えた後の生細胞数]}}{\text{[播種細胞数]}} \times 100$$

結果は図4の通りである。

#### 【0060】

図3に示すように、電圧を加えない場合では全く遺伝子導入が起こらなかった。一方、電圧を印加することにより遺伝子導入が確認された。明視野顕微鏡像から求めた電極上の全接着細胞数、ならびに、蛍光顕微鏡像から求めた蛍光タンパク質発現細胞数を用いて、次式により遺伝子導入効率を算出した。

#### 【数2】

$$\text{遺伝子導入効率(\%)} = \frac{\text{[蛍光タンパク質の発現の見られた細胞数]}}{\text{[電極上に接着していた全細胞数]}} \times 100$$

電場強度75V/cmで遺伝子導入効率は最も高く、200V/cm以上になると導入効率の著しい低下がみられた。また、図4に示すように、トリパンブルー色素排除法によるパルス印加後の細胞生存率は、電場強度100V/cm以下において高い細胞生存率を維持していたが、150V/cm以上になると電気パルス印加のショックによる細胞の剥離や細胞死がみられ、細胞への障害が顕著に認められた。電圧を加えなければ遺伝子導入が

起こらない結果より、電気パルスにより電極表面からのDNAの剥離、さらにそれに引き続く電気パルスによる細胞膜の不安定化、もしくは穿孔形成を経てDNAを取り込んでいることを示す。

#### 【実施例 3】

##### 【0061】

実施例 1 と同様の方法で DNA 担持金電極基板の上に HEK 293 細胞を播種し、接着させた後、電気パルスを印加（電場強度  $75 \text{ V/cm}$ 、パルス幅  $10 \text{ msec}$ 、パルス回数 1 回）してエレクトロポレーションを行った。その際、固定化するカチオン性高分子の分子量を変化させ、遺伝子導入効率に対するカチオン性高分子の分子量の効果について検討した。カチオン性高分子は、分子量 800、25000 および 750000 のポリエチレンジイミン（PEI 800、PEI 25000、PEI 750000 と表示、いずれもアルドリッチ社製）、ならびに分子量 15000 および 70000 のポリアリルアミン塩酸塩（PAA 15000、PAA 70000 と表示、いずれもアルドリッチ社）を使用した。

##### 【0062】

図 5 に遺伝子導入効率とポリエチレンジイミン、ポリアリルアミンの分子量の関係を示す。この図からわかるように、ポリエチレンジイミンの分子量が増加すると、遺伝子導入効率は低下した。図 6 に各表面に担持された DNA の量を示す。さらに、電気パルス（電場強度  $75 \text{ V/cm}$ 、パルス幅  $10 \text{ msec}$ 、パルス回数 1 回）を印加後、上清中に含まれる DNA 量をピコグリーンで測定することにより、表面から遊離した DNA 量を評価した。その結果は図 7 に示すとおりである。これらの図から明らかなように、高分子量になるにつれて、DNA の担持量は増加したが、電気パルス印加後の表面からの DNA 遊離量は極めて少なかった。反対に、低分子量のポリエチレンジイミン表面（PEI 800）においては、DNA 担持量は少ないものの、電気パルスの印加によって、担持された DNA の約 30% が遊離した。

##### 【0063】

各カチオン表面における遺伝子導入効率とパルス後に遊離した DNA 量の関係を図 8 に示す。この図から明らかなように、遺伝子導入効率と DNA 遊離量の間には正の相関が認められた。この結果は、本発明において遺伝子導入効率は表面からの DNA の遊離量に強く依存していることを示唆する。

#### 【実施例 4】

##### 【0064】

実施例 1 と同様の方法で DNA 担持金電極基板上に HEK 293 細胞を播種し、接着させた後、電気パルスを印加しエレクトロポレーションを行った。その際、細胞播種時から電気パルスを印加するまでの時期を変化させ、遺伝子導入効率に対する細胞培養期間の効果について試験した。

図 9 に、細胞播種から 24、48、72 時間の所定時間後に電気パルスを印加し、パルス印加のときから 48 時間後の細胞の位相差顕微鏡像を示す。この図から細胞播種から 24、48、72 時間後のいずれの場合も、遺伝子が効率よく導入され発現していることがわかる。また、図 10 に、電気パルス印加時間と遺伝子導入効率（%）との関係を示す。この結果から、細胞播種から 12、24、48、72 時間後のいずれの場合も高い遺伝子導入効率が保たれており、望ましい時間に接着細胞へ遺伝子を導入することが可能であることがわかる。

#### 【実施例 5】

##### 【0065】

（初代細胞での実証）

ラット胎児脳から海馬を採取し、神経細胞を得た。この初代神経細胞に対し、実施例 1 と同様の方法で EGFP または赤色蛍光タンパク質（DsRed）をコードするプラスミドの導入を行った。

すなわち、実施例 1 と同様にして、カチオン性表面金電極基板（カチオン性高分子：P

E I 8 0 0) 表面に、緑色蛍光タンパク質 (E G F P) および赤色蛍光タンパク質 (D s R e d) をコードするプラスミド DNA (p E G F P および p D s R e d、クロンテック社製) を担持させ、その表面上で前記初代神経細胞を 3 日間培養し、電気パルス (1 2 5 V / c m、1 0 m s e c、パルス回数 1 回) を負荷した。電気パルス負荷から 4 8 時間後に導入遺伝子の一過性解析を実施例 1 と同様に行った。

#### 【0066】

(結果)

図 1 1 に電気パルス負荷から 4 8 時間後の明視野位相差顕微鏡像 (左、phase contrast) および蛍光顕微鏡像 (中、右、E G F P、D s R e d) を示す。左図の顕微鏡像から見る限り、エレクトロポレーションによる細胞障害は見られない。また中図および右図の蛍光顕微鏡像から、p E G F P および p D s R e d の両遺伝子が細胞に導入され、それらの遺伝子がコードしている蛍光タンパク E G F P および D s R e d の発現した様子が確認できる。また、この図から、本遺伝子導入方法により複数の遺伝子を効率よく細胞に導入できることがわかる。

#### 【0067】

遺伝子導入効率は 2 0 % であり、前記 H E K 2 9 3 細胞と同様に遺伝子導入を確認することができた。比較のため、従来の方法であるリポフェクション法 (下記比較例 1 参照) およびエレクトロポレーション法 (下記比較例 2 参照) により前記初代神経細胞に遺伝子 (p E G F P / p D s R e d) を導入したところ、遺伝子導入効率は 1 0 ~ 2 0 % と本発明による手法と有意な差は認められなかった。しかしながら、従来の方法では、細胞への障害が大きく、多くの死細胞が認められた。そのときの死細胞率は 2 0 ~ 3 0 % であった。一方、本発明による遺伝子導入法では細胞障害は全くみられなかった。

#### 【0068】

(比較例 1)

採取した海馬神経細胞を 7 0 ~ 8 0 % のコンフルエンスになるように、ポリ L - リジンコートされた 2 4 ウェルプレートに播種し、リポフェクタミン (Lipofectamine) 2 0 0 0 (インビトロジェン社製) を用いて遺伝子導入を行った。遺伝子 DNA は 1  $\mu$  g、リポフェクタミン 2 0 0 0 は 2  $\mu$  l を使用した。リポフェクション 2 0 0 0 と DNA は 5 0  $\mu$  l の O p t i - M E M (無血清培地) にそれぞれ希釈した。両溶液を混合し、2 0 分室温放置した後、細胞に添加しリポフェクションを行った。リポフェクションから 4 8 時間後に E G F P の発現を蛍光顕微鏡で確認した。上述のように、遺伝子導入効率は 1 0 ~ 2 0 % であった。

#### 【0069】

(比較例 2)

採取した海馬神経細胞を P B S で洗浄し、 $1 \times 10^6$  細胞 / m L の細胞懸濁液を調製した。その懸濁液 2 0 0  $\mu$  l にプラスミド DNA (p E G F P) 1 5  $\mu$  g を加え混合した。この溶液をエレクトロポレーションキュベットに注入し、1 0 分間、氷上に静置した。その後、電場強度 6 2 5 V / c m (電極間距離: 4 m m)、パルス幅 1 0 m s e c、パルス回数 1 回の条件でエレクトロポレーションを行った。処理後、1 0 分間、室温に放置した後、P L L コート 6 0 m m 細胞培養皿に播種した。エレクトロポレーションから 4 8 時間後に E G F P の発現を蛍光顕微鏡で確認した。上述のように、遺伝子導入効率は 1 0 ~ 2 0 % であった。

#### 【実施例 6】

#### 【0070】

実施例 1 と同様にして調製したカチオン性表面金電極基板の表面に、異なる遺伝子 (p E G F P または p D s R e d) を、それぞれ電極上の直径 5 m m の部位に限定して、用手法により担持させた。以下実施例 1 と同様にして、DNA 担持金電極基板の表面に H E K 2 9 3 細胞を接着、成長させ、播種 2 4 時間後に非接着細胞を除去した後、電気パルス (7 5 V / c m、1 0 m s e c、パルス回数 1 回) を負荷した。

図 1 2 に電気パルス負荷から 4 8 時間後の明視野位相差顕微鏡 (左) および蛍光顕微鏡

像(右)を示す。左図は、基板全体(約 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ )を観察するために低倍率観察を行った。細胞が基板表面に均一に接着していることがわかる。また右図は、pEGFPおよびpDsRedの遺伝子を固定した領域についての蛍光を各々観察し、重ね合わせ処理したものであり、各遺伝子の固定化領域において、その遺伝子産物に由来する蛍光が観察できる。これらのことから、本発明方法は、場所を限定した遺伝子導入が可能であることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0071】

本発明にかかる核酸導入法は、細胞障害を与えず、効率よく遺伝子導入が可能であり、さらに遺伝子導入の時期、場所を限定できる。このため、本発明にかかる核酸導入法は、細胞レベルでの遺伝子や遺伝子産物の機能解析が効率よく実施でき、細胞生物学、ポストゲノム、プロテオーム研究を大きく促し、医療への多大な貢献をなすものである。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】 接着細胞への遺伝子導入を行うための核酸担持金電極基板ならびに該基板への電気パルス負荷システムの配置図である。

【図2】 電気パルス(電場強度 $75 \text{ V/cm}$ 、パルス幅 $10 \text{ msec}$ 、パルス回数1回)を印加してから48時間後のHEK293細胞の明視野位相差顕微鏡写真(A)および蛍光顕微鏡写真(B)である。スケールバー  $200 \mu\text{m}$

【図3】 遺伝子導入効率に対する電場強度の効果を示す棒グラフである。

【図4】 細胞生存率と電場強度の関係の示す線図である。

【図5】 遺伝子導入効率に対するポリエチレンジイミン、ポリアリルアミンの分子量の効果を示す線図である。

【図6】 各種カチオン表面におけるDNAの担持量を示す線図である。

【図7】 各種カチオン表面におけるパルス後のDNA遊離量を示す線図である。

【図8】 遺伝子導入効率とDNA遊離量の関係を示す相関図である。

【図9】 電気パルスを印加するまでの細胞培養期間を変化させたときの、電気パルス印加48時間後の蛍光顕微鏡像(A, B, C)である。

【図10】 電気パルスを印加するまでの細胞培養期間を変化させたときの、遺伝子導入効率を示す線図である。

【図11】 初代神経培養細胞に遺伝子(pEGFPおよびpDsRed混合物)を導入したときの、電気パルス負荷から48時間後の明視野位相差顕微鏡(左)および蛍光顕微鏡像(中、右)である。上段および下段の写真は、同一の条件下で遺伝子導入を行ったときの異なる視野における観察像である。

【図12】 異なる遺伝子(pEGFPまたはpDsRed)を、場所を限定してHEK293細胞に導入したときの、電気パルス負荷から48時間後の明視野顕微鏡(左)および蛍光顕微鏡像(右)である。

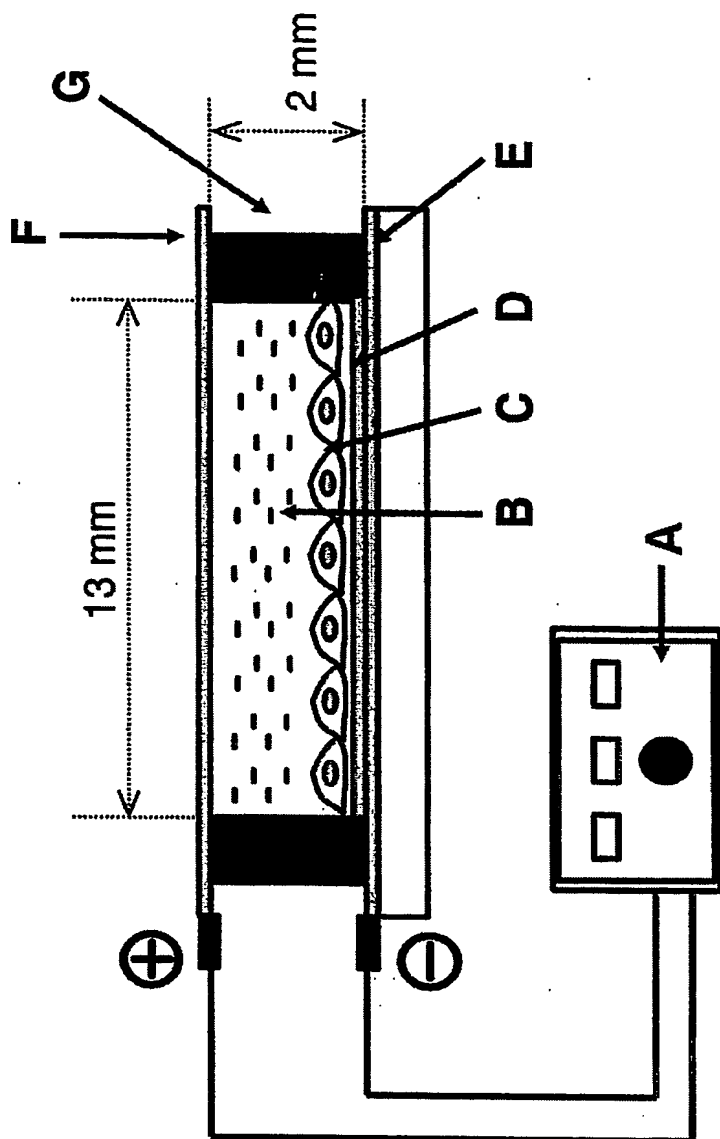
【符号の説明】

【0073】

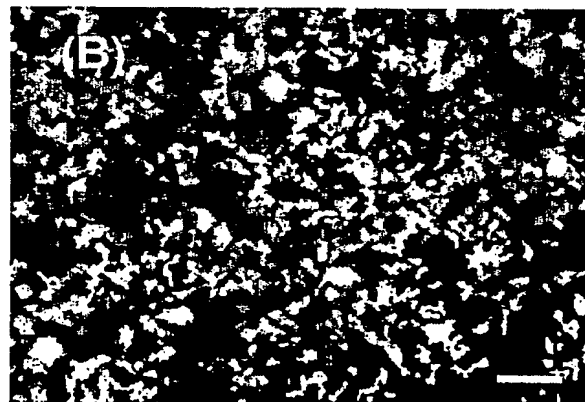
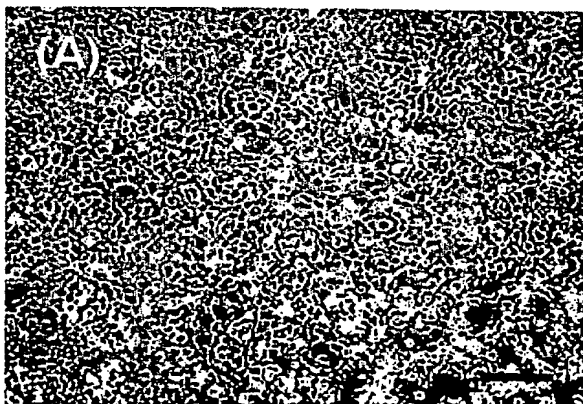
図1における記号の意味は次の通りである。

- A エレクトロポレーター
- B エレクトロポレーションバッファー
- C 細胞
- D 核酸-カチオン性高分子複合層
- E 金薄膜電極(陰極)
- F 金電極(陽極)
- G シリコンスペーサ

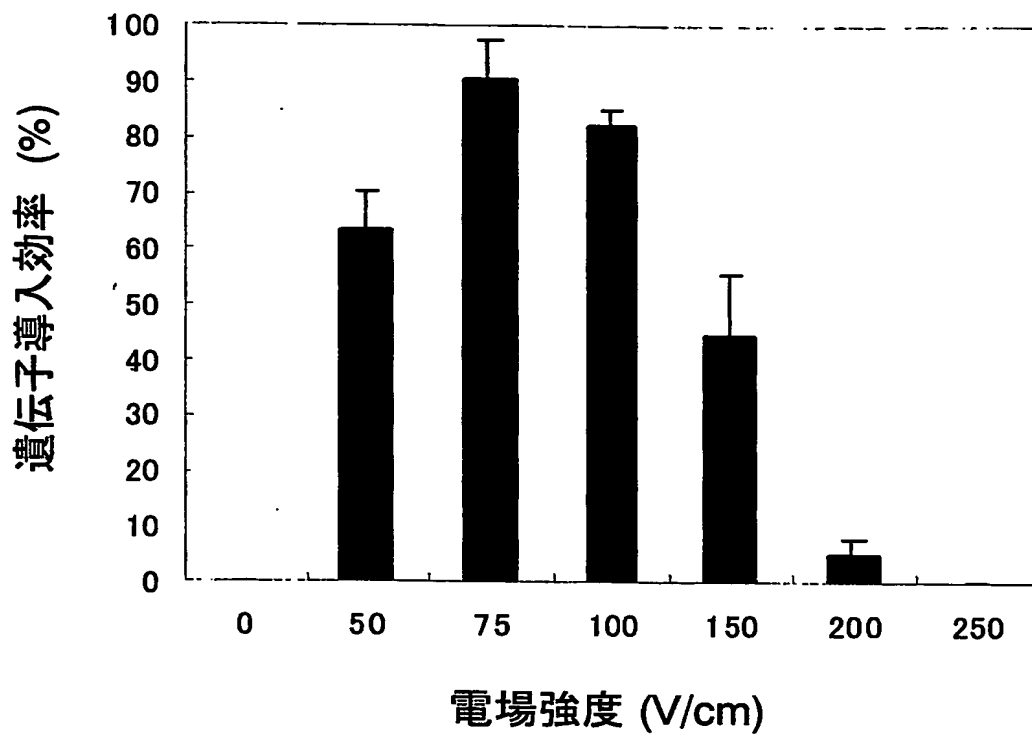
【書類名】 図面  
【図 1】



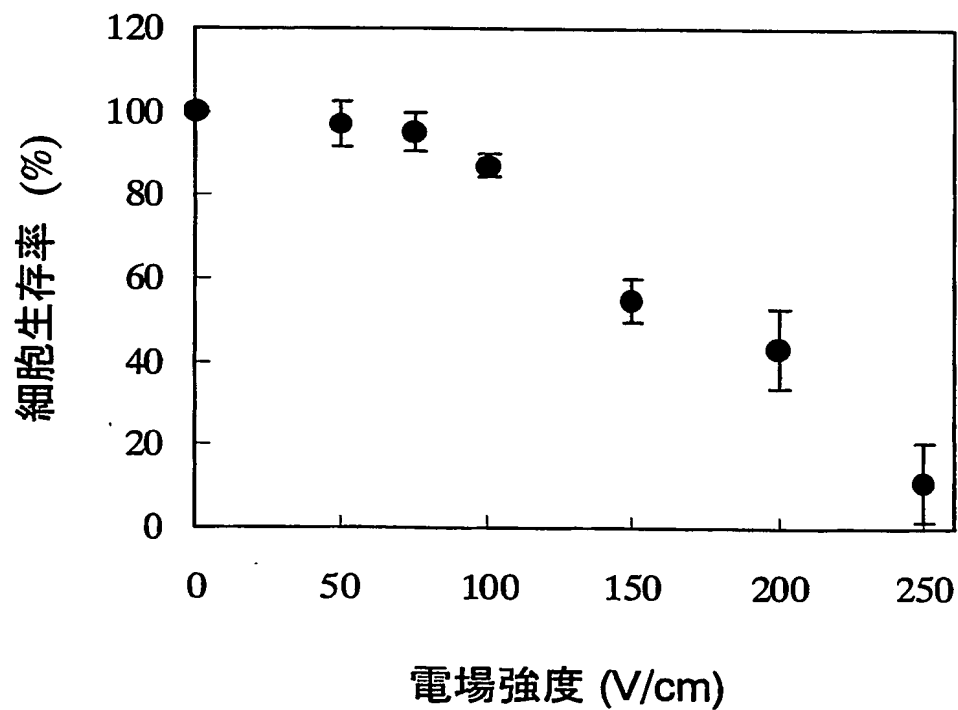
【図 2】



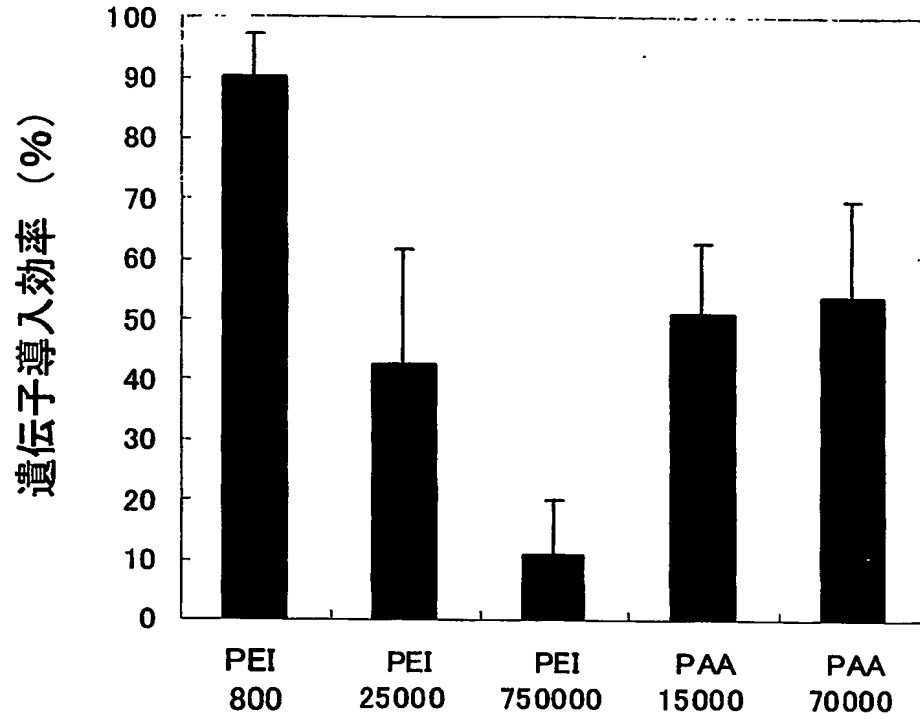
【図 3】



【図 4】

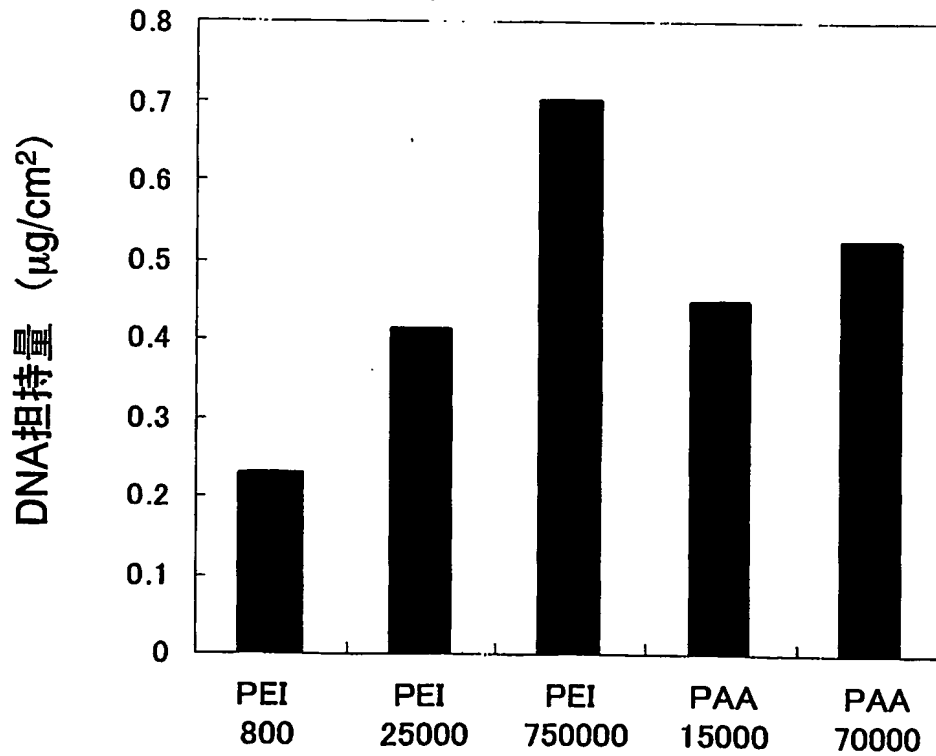


【図 5】



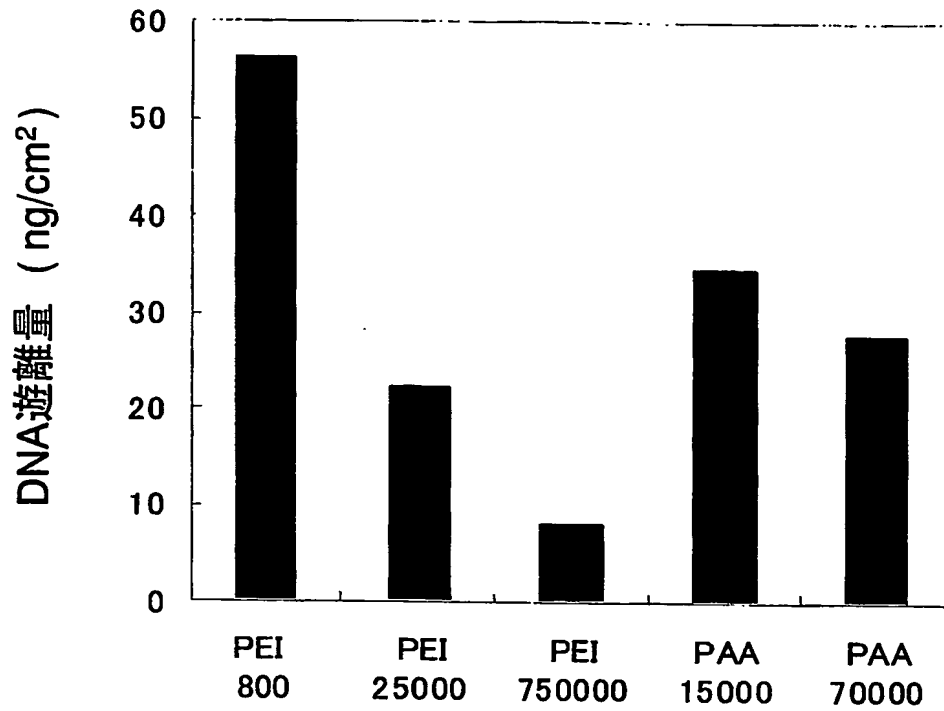
## DNA担持表面

【図 6】



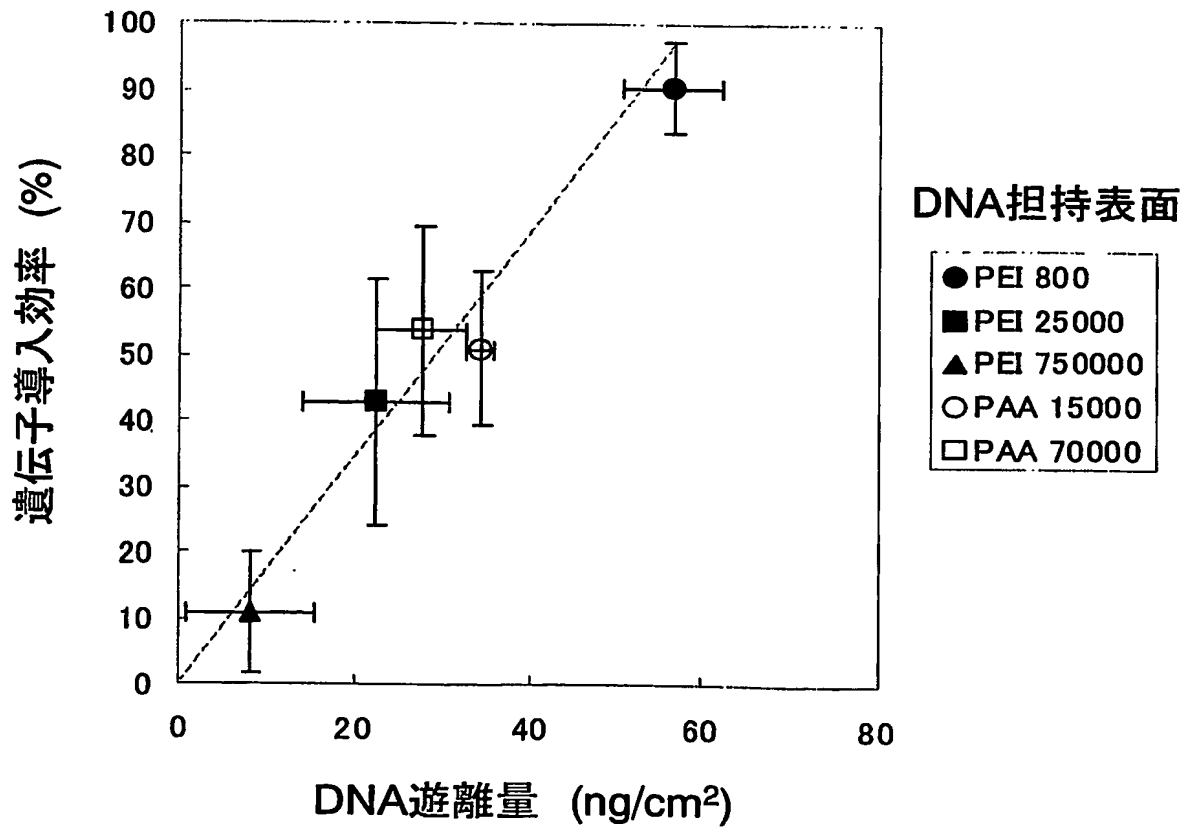
## DNA担持表面

【図7】

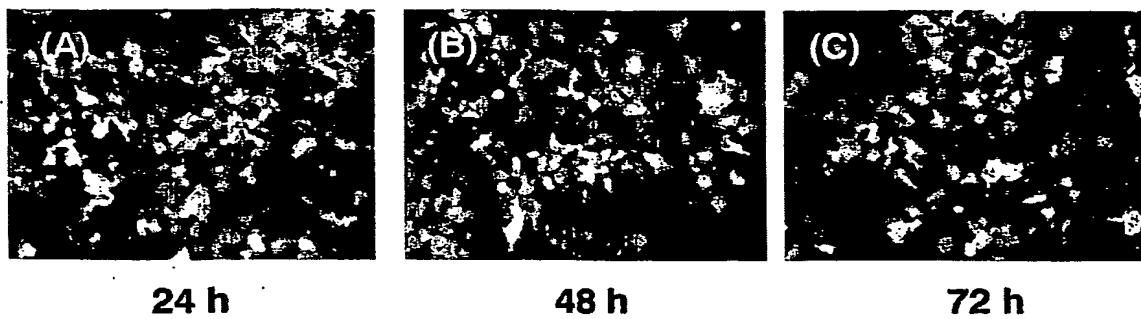


DNA担持表面

【図8】

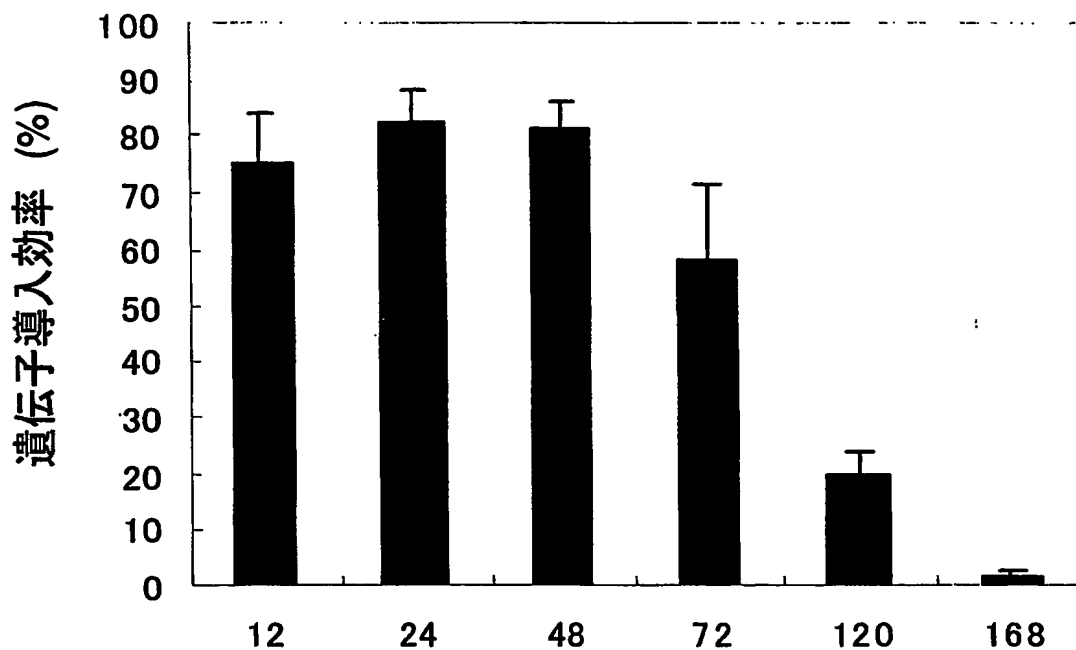


【図 9】



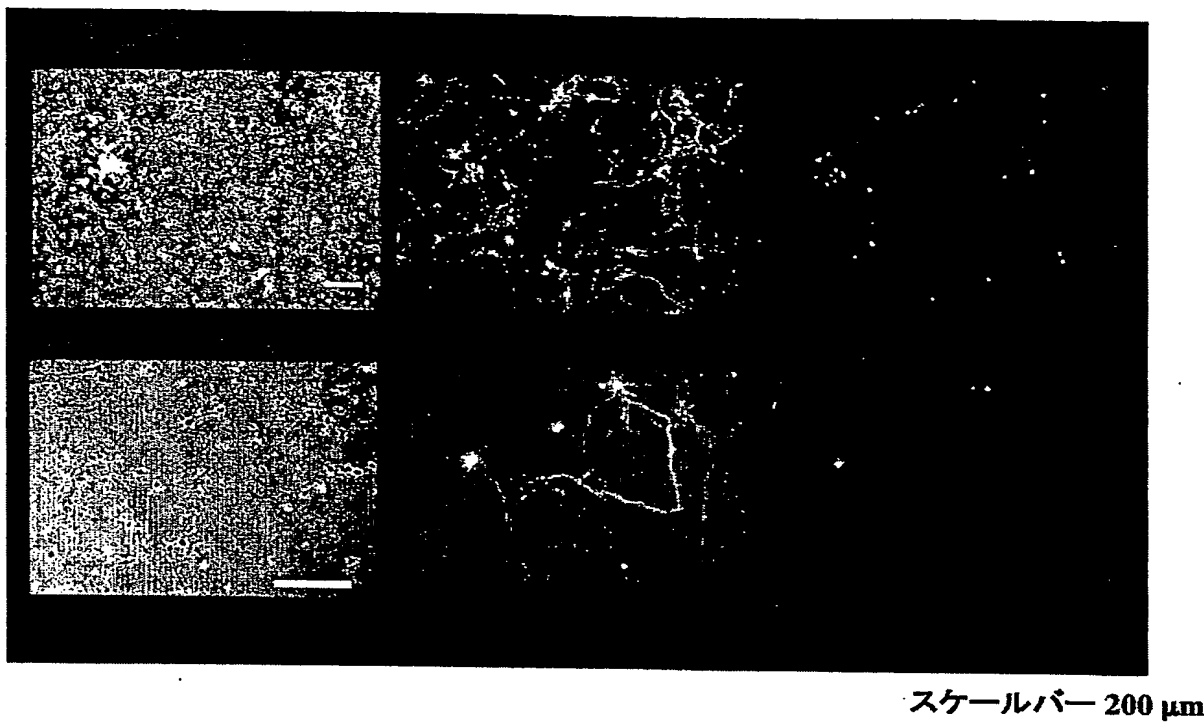
プラスミドDNA固定電極上での電気パルスをかけるまでの  
細胞培養期間 (時間)

【図 10】

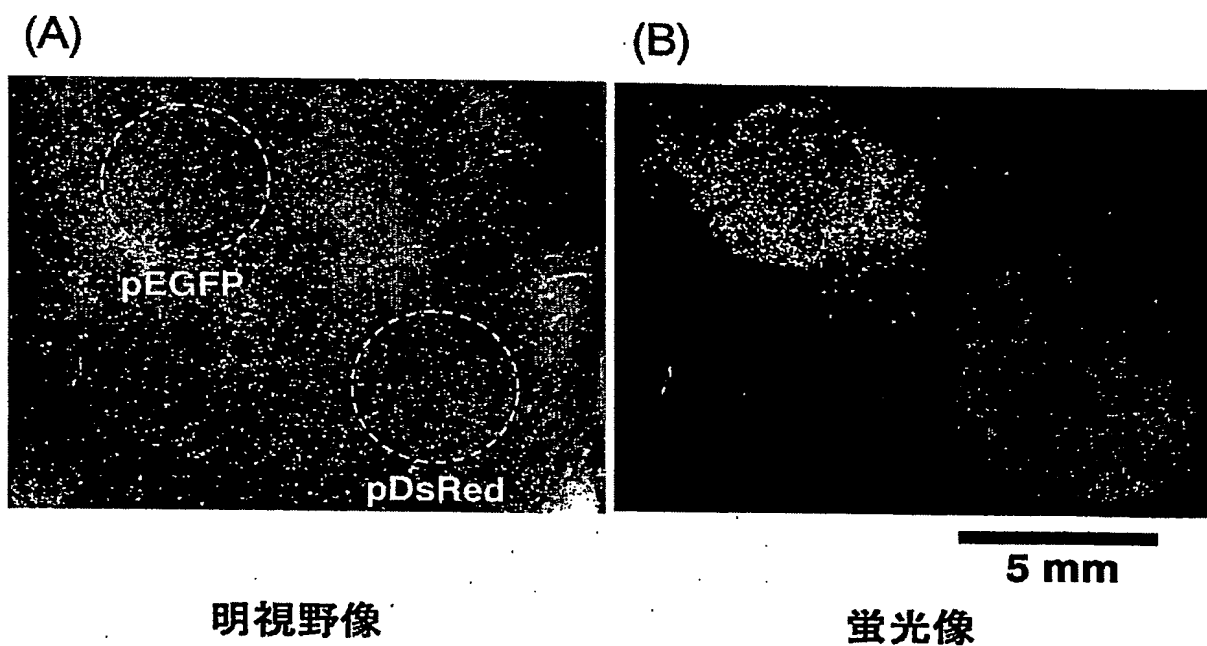


プラスミドDNA固定電極上での電気パルスをかけるまでの  
細胞培養期間 (時間)

【図 11】



【図 12】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 エレクトロポレーション法により、接着性細胞に障害を与えることなく、遺伝子を効率よく細胞に導入するとともに、望ましい時期に望ましい位置で遺伝子を導入し得る方法を提供すること。

【解決手段】 エレクトロポレーション法により細胞に核酸を導入する方法であって、(A) 電極の表面に核酸を担持させる工程；(B) 得られた核酸担持電極の表面に細胞を接着させる工程；および (C) 接着した細胞に電気パルスを印加する工程、からなる方法。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 I10J1126  
【提出日】 平成16年 7月20日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-349343  
【承継人】  
【識別番号】 504132272  
【氏名又は名称】 国立大学法人京都大学  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100077012  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 岩谷 龍  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 066372  
【納付金額】 4,200円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 持分譲渡証書 1  
【提出物件の特記事項】 同日に補充する。  
【物件名】 委任状 1  
【提出物件の特記事項】 同日に補充する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-349343
受付番号	50401216086
書類名	出願人名義変更届
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成16年 8月30日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	504132272
【住所又は居所】	京都府京都市左京区吉田本町36番地1
【氏名又は名称】	国立大学法人京都大学
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100077012
【住所又は居所】	大阪府大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル5階 岩谷国際特許事務所
【氏名又は名称】	岩谷 龍

特願2003-349343

出願人履歴情報

識別番号

[500160251]

1. 変更年月日

2000年 4月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府三島郡島本町若山台1-5-8-203

氏 名

岩田 博夫

特願 2003-349343

出願人履歴情報

識別番号

[503090522]

1. 変更年月日

2003年 3月 7日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市茶戸町 17-3

氏 名

加藤 功一

特願 2003-349343

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[504132272]

1. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市左京区吉田本町36番地1

氏 名

国立大学法人京都大学

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**